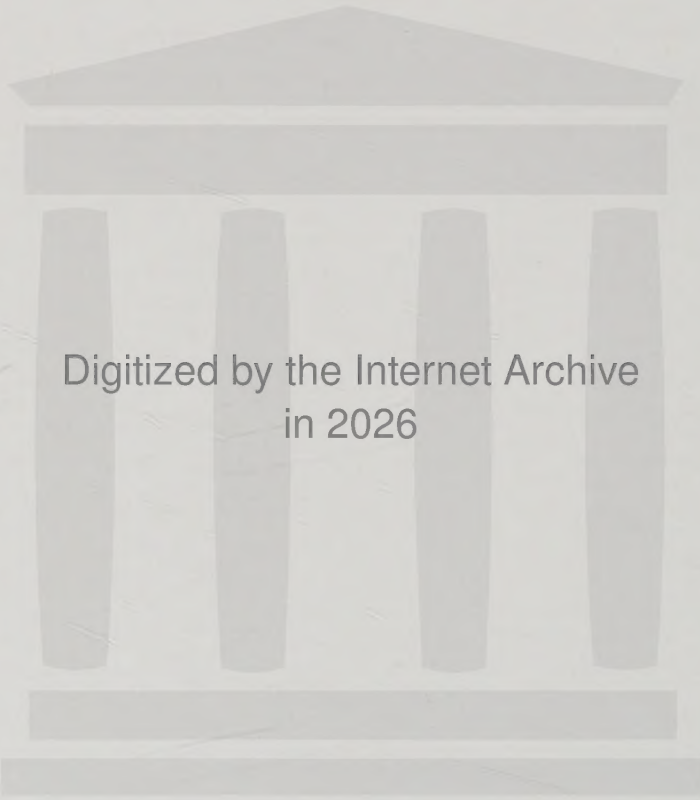


**Untersuchungen zur Ursache
der unterschiedlichen Restaktivität nach Vergiftung
menschlicher Serumcholinesterase (E.C.3.1.1.8.) durch
E 600 (0,0-Diäthyl-0- p-nitrophenyl)-phosphat)**

von
Irmgard Walter
aus
Erlangen



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548401_0060

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

**Untersuchungen zur Ursache
der unterschiedlichen Restaktivität nach Vergiftung
menschlicher Serumcholinesterase (E.C.3.1.1.8.) durch
E 600 (0,0-Diäthyl-0-) p-nitrophenyl)-phosphat)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg



vorgelegt

von

Irmgard Walter

aus

Erlangen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Schiefer

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher von Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 7. 1971

Matri et memoriae patris

Inhaltsverzeichnis

Seite

A) EINLEITUNG	4
B) PROBLEMSTELLUNG	8
1. Polymorphismus der Serum-Cholinesterase	8
2. Polymorphismus des E 600-spaltenden Fermentes	8
3. Empfindlichkeit menschlicher Erythrozyten-Cholinesteraseaktivität gegen E 600	10
C) ERSATZ DER SERUMCHOLINESTERASE E.C.3.1.1.8. DURCH ERYTHROZYTEN-ACETYLCHOLINESTERASE E.C.3.1.1.7.	14
1. Geräte und Reagenzlösungen	15
2. Bestimmung des Serumtyps	15
3. Gewinnung von Serum und Erythrozyten-hämolysat	15
4. Vergiftung der Serumcholinesterase durch DFP und Zugabe von Erythrozyten-Acetylcholinesterase	16
5. Inkubation der Erythrozyten-Acetylcholinesterase mit E 600	17
6. Messung der Fermentaktivitäten	18
7. Gleichzeitige Untersuchung von je zwei Versuchspersonen mit identischem Serumtyp	19
8. Gleichzeitige Prüfung von zwei Versuchspersonen mit hohem und niedrigem Serumtyp	20
D) DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG	23
E) LITERATURVERZEICHNIS	25

A) EINLEITUNG

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) sowie GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und LINDORF (1969) stellten Unterschiede in der Vergiftbarkeit menschlicher Serumcholinesterasen mit dem Alkylphosphat E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) fest. Bei Untersuchungen menschlicher Serumcholinesterasen mit E 600 in vitro nach der Methode von FRIEDBERG und SAKAI (1958) in der Warburg-Apparatur wurde nach Inkubation mit E 600 in einer Konzentration von $1,6 \times 10^{-7}$ molar über eine Stunde bei 37° C in allen Fällen eine völlige Vergiftung der Acetylcholin-spaltenden Serumfermente festgestellt. Bei Inkubation von 75 Seren nicht verwandter Personen (41♂, 34 ♀) mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration dagegen waren nicht alle Seren völlig vergiftet.

Die Cholinesteraseaktivität wurde in einer Warburg-Apparatur Typ V 85 der Firma Braun, Melsungen, mit der manometrischen Methode von AMMON (1934) in der Modifikation von FRIEDBERG und SAKAI (1958), jedoch bei einem pH-Wert von 7,2 bestimmt. Die Bedingungen der Inkubation mit E 600 wurden auf die nachfolgende Aktivitätsmessung abgestimmt.

Für die Vergiftung des Fermentes wurden zwei verschiedene E 600 Konzentrationen verwendet. Hierzu wurden zunächst

I. 1 ul E 600 auf 100 ml H_2O

II. 1 ul E 600 auf 20 ml H_2O

gegeben. Je 20 ul Lösungen I und II wurden sodann zu 27 ml der als Verdünnungsflüssigkeit für das Serum verwendeten Salzlösung gebracht. Diese Verdünnungsflüssigkeit war eine Mischung aus 10 Teilen einer 0,9 %igen NaCl-Lösung und 3 Teilen einer 1,26 %igen $NaHCO_3$ -Lösung.

Zur Vergiftung wurden 0,15 ml Serum mit 1,35 ml der mit I oder II versetzten E 600-haltigen Verdünnungsflüssigkeit versetzt. Die E 600-Konzentration im Inkubationsansatz war bei Zusatz von

I: $3,2 \times 10^{-8}$ molar

II: $1,6 \times 10^{-7}$ molar.

Von den Inkubationsansätzen wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirne eines Warburggefäßes gegeben, das im Hauptraum 1,5 ml einer 0,5 %igen wässrigen Lösung von Acetylcholinchlorid enthielt, an ein Manometer angeschlossen und in ein Wasserbad von $37^{\circ} C$ gebracht. Anschließend wurden alle Manometer mit einem CO_2 - N_2 -Gemisch aus 5 % CO_2 und 95 % N_2 20 min. durchströmt. Sodann wurde noch so lange bei $37^{\circ} C$ inkubiert, bis eine Gesamtinkubationsdauer von 60 min. erreicht war. Der pH-Wert lag während der Inkubation etwa bei 7,7 (SÜLLMANN 1964).

Nach beendigter Inkubation wurde die Serumverdünnung in der Anhangsbirne in den Hauptraum der Warburggefäße gekippt. Der pH-Wert lag nun bei 7,2 (SÜLLMANN 1964). Es wurde bei geöffneten Hähnen 3 min. geschüttelt (Schüttelfrequenz 100/min.) und anschließend das System geschlossen. Der Manometerstand wurde sodann eine Stunde lang alle 15 min. abgelesen.

Die Seren wurden in Doppelbestimmungen mit und ohne E 600 auf ihre Aktivität getestet. Die Angabe der Aktivität erfolgt in $\mu\text{l CO}_2/\text{Std.}$, bezogen auf 0,05 ml Serum.

Die bei den 75 Versuchspersonen erhaltenen Einzelwerte nach Inkubation mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration erlauben eine Einteilung der untersuchten Seren in drei Gruppen oder Serumtypen, die nach der verbliebenen Restaktivität in % der Normalaktivität erfolgte: in eine Gruppe I mit niederer, in eine Gruppe II mit mittlerer und in eine Gruppe III mit hoher Restaktivität (Abb. 1).

Zur Verwendung kamen frische Seren gesunder nicht miteinander verwandter Erwachsener. Es wurde streng darauf geachtet, daß keine hämolytischen Seren verwendet wurden.

Die gemessenen Restaktivitäten waren unabhängig von der Ausgangsaktivität und dem Geschlecht (Abb. 2).

Abb. 1

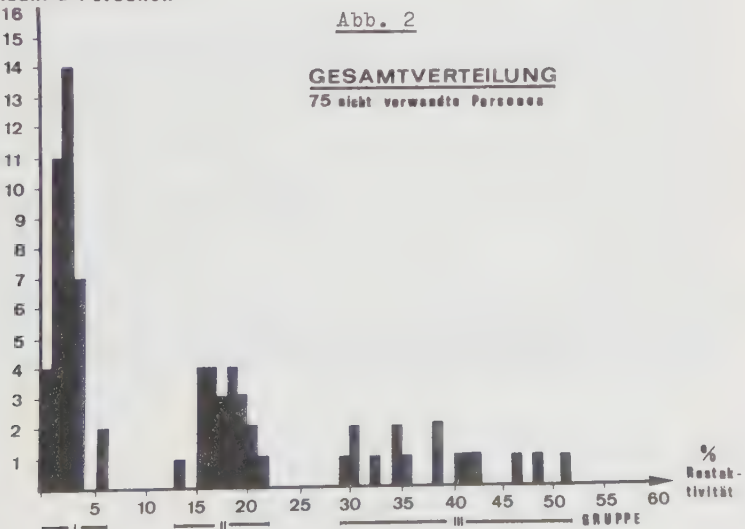
Gruppe	Anzahl d. Personen	davon		Normalaktivität in $\mu\text{l CO}_2/60 \text{ min.}$ u. 0,05 ml Serum	Restaktivität nach Vergiftung in % d. Normalaktivität
		♂	♀		
I	38	22	16	110–278	0–5,5
II	22	10	12	135–235	13–21
III	15	9	6	130–285	29–51

Normalaktivität und Restaktivität nach Vergiftung von 75
menschlichen Serumproben mit E 600 ($c = 3,2 \times 10^{-8}$ molar)

Anzahl d. Personen

Abb. 2

GESAMTVERTEILUNG
75 nicht verwandte Personen



B) PROBLEMSTELLUNG

1. Polymorphismus der Serum-Cholinesterase

Es läge nahe, die Unterschiede durch einen Polymorphismus der Serum-Cholinesterasen zu deuten. Durch Messung von Enzymaktivitäten vor und nach Inkubation mit bestimmten Hemmstoffen ist ja bei den Cholinesterasen des menschlichen Serums schon mehrfach eine Zuordnung zu gut definierten Typen erfolgt (GOEDDE, DOENICKE, ALTLAND 1967).

Es spricht aber gegen einen Polymorphismus der Serum-Cholinesterase, daß bei 20 Probanden, nämlich 11 mit niedriger, 6 mit mittlerer und 4 mit hoher Restaktivität bezüglich der bisher ermittelten Serum-Typen normales Pseudocholinesterase-Protein gefunden wurde (GELDMACHER-v. MALLINCKRODT und LINDORF 1969).

2. Polymorphismus des E 600-spaltenden Fermentes

Neben einem neuen Polymorphismus der Serum-Cholinesterase muß aber eine weitere Möglichkeit in Betracht gezogen werden: ALDRIDGE (1953) fand im Serum von Kaninchen, Ratte und Pferd ein E 600-spaltendes Enzym, Arylesterase 3.1.1.2. (auch A-Esterase oder Paraoxonase genannt). FRIEDBERG und ERDMANN (1959) konnten dies für Serum von Rind und Pferd bestätigen. SKRINJARIK-SPOLJAR und REINER (1968) sowie

KRISCH (1968) wiesen nach, daß auch menschliches Serum eine Arylesterase besitzt. Diese spaltet E 600 in einer Konzentration, die weit über der für eine völlige Vergiftung der Cholinesterase erforderlichen liegt. Nach den Untersuchungen von KRISCH liegt das pH-Optimum dieser Reaktion bei 11,0 - 11,6. SKRINJARIK-SPOLJAR und REINER fanden aber auch eine meßbare Spaltung bei pH 7. Bei der Untersuchung der Arylesterase-Aktivität im Serum von 25 Männern und 25 Frauen konnte KRISCH (1968) zwei sich überlagernde Gruppen erkennen, die sich durch die Höhe der Fermentaktivität unterschieden, wobei es ihm aber wegen dieser Überlagerungen im Einzelfall nicht möglich war, eine Versuchsperson sicher einer der beiden Gruppen zuzuordnen. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der nach KRISCH (1968) gemessenen Arylesterase und die von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) festgestellten Serumtypen eine starke Korrelation aufweisen (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, PETENYI und BAUMGARTNER). Personen mit niedriger Arylesteraseaktivität im Serum weisen also auch eine niedrige Serum-Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 in geeigneter Konzentration auf.

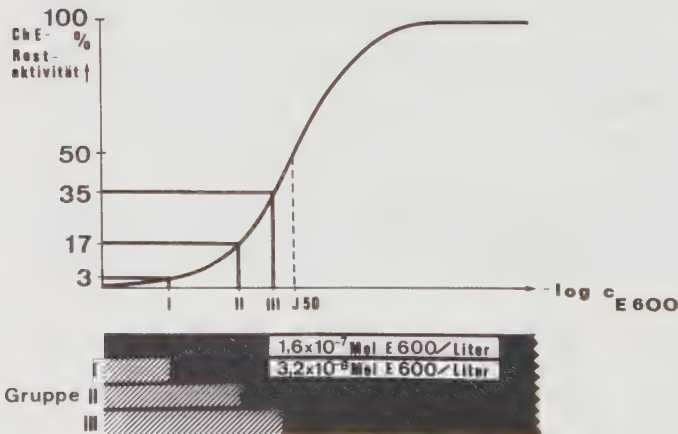
KRISCH denkt an genetische Ursachen; diese These wird von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und LINDORF (1969) durch ihre

Untersuchungen an 17 Familien mit insgesamt 65 Personen gestützt.

Berücksichtigt man alle genannten Untersuchungen, so lassen sich (Abb. 3) die unterschiedlichen Restaktivitäten auch durch die Annahme deuten, daß während des Ablaufs der Cholinesterasehemmung durch E 600 Unterschiede einer Phosphatase-Aktivität die E 600-Konzentration so variieren, daß unterschiedliche Restaktivitäten der Cholinesterasen verbleiben, wobei die Cholinesterasen selbst keinen Polymorphismus aufweisen sondern lediglich als empfindliches Indikatorsystem für die verbleibende E 600-Konzentration und damit für die jeweilige Phosphatase-aktivität dienen.

Abb. 3

Hemmung von Serumcholinesterase durch E 600 als konkurrierende Reaktion zu der E 600-Spaltung durch Paraoxonase.



3. Empfindlichkeit menschlicher Erythrozyten- Cholinesteraseaktivität gegen E 600

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten entscheiden zu können, prüften GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und LINDORF (1969) zunächst, ob bei Personen mit in der eingangs beschriebenen Versuchsanordnung bereits bestimmtem unterschiedlichem Serumtyp bei Vergiftung der Serum-Cholinesterase 3.1.1.8. mit E 600 auch die jeweilige Erythrozyten-Acetylcholinesterase 3.1.1.7. entsprechende Unterschiede aufweist.

Es wurden die Blutproben von 20 gesunden, nicht miteinander verwandten Erwachsenen in einer Warburg-Apparatur Typ V 85 der Firma Braun, Melsungen, mit der manometrischen Methode von AMMON (1934) untersucht.

Die bei den 20 Probanden beiderlei Geschlechts erhaltenen Einzelwerte nach Inkubation mit E 600 in $0,8 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

Die 20 untersuchten Hämolysate zeigten nach Vergiftung mit E 600 in $0,8 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration eine Aktivität von durchschnittlich 52 %. Berücksichtigt man, daß die hier gewählte E 600-Konzentration im Bereich von I_{50} lag, d.h. im steilen Teil der Kurve, welche die Beziehung zwischen Restaktivität und dem negativen Logarithmus der Hemmstoffkonzentration wiedergibt, so ist die Streuung der Meßwerte von 4,8 % verständlich und wohl allein auf die Fehlerbreite der Methodik zurückzuführen.

Tabelle 1: Beeinflussung der Aktivität menschlicher Erythrozytencholinesterase nach Vergiftung mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) in $0,6 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration (LINDORF 1971)

E r y t h r o z y t e n				
Proto- koll Nr. Geschl.	Serum- Typ	norm. Akt. ul CO_2 /30 min.	Restakt. n. Vergiftg.m. E 600 C = $0,6 \times 10^{-8}$ molar	Restakt. in % der norm. Akt.
1. ♂	hoch	274	123	55
2. ♂	niedrig	203	103	49
3. ♀	mittel	252	112	55,5
4. ♂	mittel	160	84	48
5. ♂	niedrig	210	120	43
6. ♂	niedrig	242	104	57
7. ♀	hoch	196	101	48,5
8. ♀	niedrig	134	63	53
9. ♂	niedrig	240	106	56
10. ♂	niedrig	156	67	57
11. ♀	hoch	190	91,5	52
12. ♂	hoch	225	110	56
13. ♀	niedrig	182	94	48,5
14. ♂	mittel	208	109	47,5
15. ♀	mittel	234	138	41
16. ♀	hoch	260	151	49,5
17. ♂	niedrig	210	101	54
18. ♀	niedrig	276	114	54
19. ♂	hoch	184	93,5	59
20. ♀	niedrig	246	108	56

Damit ist wahrscheinlich, daß für die Reaktion menschlicher Erythrozyten-Acetylcholinesterase 3.1.1.7. im Gegensatz zu der Serumcholinesterase 3.1.1.8. durch Vergiftung mit E 600 keine Typendifferenzierung möglich ist, diese sich vielmehr homogen verhält.

Zur weiteren Klärung des von GELDMACHER-v. MALLINCKRODT und LINDORF gefundenen Phänomens wurde in der vorliegenden Arbeit die Acetylcholinesterasenaktivität mit und ohne Vergiftung durch E 600, nach Ersatz der Serumcholinesterase 3.1.1.8. durch die Erythrozyten-Acetylcholinesterase 3.1.1.7., gemessen. Dies war durch Vergiftung der Serumcholinesterase durch DFP möglich.

C) ERSATZ DER SERUMCHOLINESTERASE E.C. 3.1.1.8. DURCH
ERYTHROZYTEN-ACETYLCHOLINESTERASE E.C. 3.1.1.7.

Menschliche Serumcholinesterase 3.1.1.8. wird durch DFP (O,O-Diisopropyl-fluorophosphat) rasch und irreversibel gehemmt (MAZUR und BODANSKY 1946, MAZUR 1946).

Die enzymatische Spaltung von E 600 durch Arylesterase dagegen erfährt nach KRISCH (1968) durch DFP in einer Konzentration von 10^{-4} molar nur eine Aktivitätsminderung von $15 \pm 6,1$ %.

Deshalb wurde bei je 8 Versuchspersonen mit niedrigem und hohem Serumtyp die Serumcholinesterase mit DFP vergiftet, durch Erythrozyten-Acetylcholinesterase ersetzt, nun letztere mit E 600 gehemmt, um zu prüfen, ob in diesen Ansätzen, die noch Serum-Arylesterase enthielten, Unterschiede in der Acetylcholinesterase-Restaktivität festzustellen waren.

Hierzu wurde vorher in einer eigenen Versuchsreihe gesichert, daß der Zusatz von Heparin zum Serum in entsprechender Menge die Arylesterase-Aktivität nach KRISCH (1968) nicht beeinträchtigt.

1. Geräte und Reagenzlösungen:

Warburg-Apparatur mit Zubehör

Bombe mit CO_2 - N_2 -Gemisch (5 %, 95 %)

Liquemin^(R) (Heparin)

wässrige Kochsalzlösung

Pufferlösung (0,2 %ige wässrige Lösung von NaHCO_3)

wässrige Acetylcholinchloridlösung 1,8 %

2. Bestimmung des Serumtyps

Von 16 gesunden Erwachsenen wurde die Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 nach GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) bestimmt.

3. Gewinnung von Serum und Erythrozyten-Hämolysat

Sodann wurde von den gleichen Personen mit einer 5 ml Re-kordspritze, in der sich 0,5 ml Liquemin^(R) befanden, genau 4,5 ml Blut entnommen, um die Serumverdünnung reproduzier-bar zu machen. Das Blut wurde sofort nach der Entnahme in einem graduierten Zentrifugenglas bei 3000 g 10 min. zen-trifugiert, und das erhaltene Serum abgehoben. Anschlies-send wurden die Erythrozyten im Zentrifugenglas dreimal mit je 6 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen und dazwi-schen jeweils 5 min. bei 3000 g zentrifugiert. Nach Abzie-hen der letzten überstehenden Flüssigkeit wurde das Ery-throzytenvolumen abgelesen und die Erythrozyten mit der 0,2 %igen NaHCO_3 -Lösung im Verhältnis 1 : 6 verdünnt. Das erhaltene Hämolysat wurde bei $+4^\circ \text{C}$ aufbewahrt und spä-testens am folgenden Tag untersucht.

4. Vergiftung der Serumcholinesterase durch DFP und
Zugabe von Erythrozyten-Acetylcholinesterase

Die Konzentration für eine leichte Übervergiftung von menschlicher Serumcholinesterase mit DFP lag unter unseren Bedingungen bei etwa $3,9 \times 10^{-7}$ molar. Um sicher eine vollständige Vergiftung zu erreichen, wählten wir eine solche DFP-Konzentration, wobei ein gewisser DFP-Überschuß im Serum verblieb. Dieser hemmte nach Zugabe von Erythrozyten-Hämolysat einen geringen Anteil der Acetylcholinesterase, was für den Versuchsablauf jedoch ohne Bedeutung ist.

Im einzelnen gingen wir wie folgt vor:

Lösung I: 1 ul DFP auf 10 ml Wasser

Lösung II: 10 ul Lg. I auf 13,2 ml 0,2 %ige NaHCO_3 -Lösung

Zur Vergiftung wurden 0,15 ml Serum mit 1,35 ml Lg. II versetzt und 30 min. bei $+22^\circ \text{C}$ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 0,5 ml des Inkubationsansatzes zu 0,9 ml des entsprechenden Erythrozyten-Hämolysates in den Hauptraum eines Warburg-Gefäßes gebracht und bei $+22^\circ \text{C}$ weitere 30 min. inkubiert, um den DFP-Überschuß mit Acetylcholinesterase zur völligen Reaktion zu bringen.

5. Inkubation der Erythrozyten-Acetylcholinesterase
mit E 600

Zur Vergiftung der Erythrozyten-Acetylcholinesterase mit E 600 verwendeten wir folgende Lösungen:

Lösung I: 1 ul E 600 auf 250 ml Wasser

Lösung II: 100 ul Lg. I auf 30 ml 0,2 %ige
NaHCO₃-Lösung

Nach Ablauf der Gesamtinkubationsdauer mit DFP von einer Stunde wurden dem Gemisch aus Serum und Erythrozyten-Hämolysat im Hauptraum der Warburg-Gefäße 0,3 ml E 600-Lösung II zugesetzt. Als Substrat befanden sich in den Anhangsbirnen der Gefäße 0,3 ml einer 1,8 %igen wässrigen Acetylcholinchlorid-Lösung. Die E 600-Konzentration im Hauptraum der Tröge war $1,0 \times 10^{-8}$ molar. Nach 35 min. Inkubationsdauer bei +22° C wurden die Gefäße an ein Manometer angeschlossen und in ein Wasserbad von +37° C gebracht. Sodann wurden diese mit dem N₂-CO₂-Gemisch durchströmt und 20 min. geschüttelt (Schüttelfrequenz 100/min.). Nach weiteren 5 min. Aequilibrierung war eine Gesamtinkubationsdauer mit E 600 von 60 min. erreicht.

6. Messung der Fermentaktivitäten

In Doppelbestimmungen wurden die folgenden Ansätze getestet:

- a) Erythrozyten-Acetylcholinesterase im (1 : 6) verdünnten Hämolysat
- b) Hämolysat + DFP-vergiftetes Serum (die Aktivität, ausgedrückt in ul $\text{CO}_2/30$ min. lag hier im Mittel durch den DFP-Überschuß im Serum um 10 ± 5 % niedriger als bei a)
- c) mit E 600 vergiftetes Gemisch aus Hämolysat und DFP-vergiftetem Serum.

Außerdem wurden zwei Leerwerte zur Bestimmung der Eigenhydrolyse des Substrats mitgeführt.

Die Angabe der Aktivitäten erfolgte in ul $\text{CO}_2/30$ min. bezogen auf 0,15 ml Erythrozytenvolumen bzw. 0,9 ml Hämolysat.

Infolge dieser Versuchsanordnung konnten in einem Arbeitsgang mit 14 Manometern jeweils zwei Versuchspersonen getestet werden.

7. Gleichzeitige Untersuchung von je zwei Versuchspersonen mit identischem Serumtyp

Da die Versuchsanordnung relativ kompliziert ist, wurde zunächst geprüft, ob bei Untersuchung von je zwei Versuchspersonen mit gleichem Serumtyp in einem Untersuchungsgang hinreichend übereinstimmende Ergebnisse zu erhalten waren. Dies wurde an je vier Versuchspersonen mit niedrigem und vier Versuchspersonen mit hohem Serumtyp getestet.

Die in jeweils einem Untersuchungsgang mit homogenem Material erhaltenen Werte für die Restaktivität der Erythrozyten-Acetylcholinesterase zeigten mit 3,7 % eine noch geringere Streuung als bei der Untersuchung der Erythrozyten-Acetylcholinesteraserestaktivität bei direkter Messung. So konnte angenommen werden, daß der vorgesehene Untersuchungsgang geeignet war, die in der Problemstellung dargelegte Fragestellung zu klären (Tabelle 2).

8. Gleichzeitige Prüfung von zwei Versuchspersonen
mit hohem und niedrigem Serumtyp

Die Prüfung erfolgte bei 16 Personen, von denen 8 einen hohen und 8 einen niedrigen Typ aufwiesen, wobei in einem Untersuchungsgang je ein hoher und ein niedriger Typ gleichzeitig untersucht wurden. Hierbei ergaben sich Differenzen, die annähernd 5 mal so hoch waren wie in der unter C 7. beschriebenen Versuchsreihe. Sie betrugen im Mittel 17 % und überschritten damit erheblich den Streubereich der Untersuchung der Erythrozyten-Acetylcholinesteraseaktivität bei direkter Messung. Dabei wiesen die Personen mit einem niedrigen Serumtyp immer jeweils die niedrigere Restaktivität der Acetylcholinesterase auf (Tabelle 3).

Bei Prüfung mit dem χ^2 -Verfahren ergab sich, daß die zwischen zwei Versuchspersonen in je einem Untersuchungsgang erhaltenen Aktivitätsunterschiede signifikant sind ($P = 99,0 \%$).

Tabelle 2

Beeinflussung der Aktivität menschlicher Erythrozyten-Acetylcholinesterase nach Vergiftung mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) in $1,0 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration

Personen	Serumtyp	a)	Diff. a)-b)	b)	c)	Restaktivität in % der Hämolyseaktivität
Wal. E. ♂	niedrig	315	56	249	104	41,7
Ste. W. ♂	niedrig	310	54	256	100	39
Schö.E. ♀	hoch	226	51	175	105	60
Schö.K. ♂	hoch	365	33	332	207	62,3
Leh. V. ♂	niedrig	336	45	291	143	49,1
Schü. ♂	niedrig	347	25	322	154	47,8
Schö.I. ♀	hoch	282	41	241	134	55,6
Flo. ♀	hoch	308	30	278	178	64,3

Tabelle 2 und 3:

- a) = Erythrozyten-Acetylcholinesterase im (1 : 6) verdünnten Hämolysat
- b) = Hämolysat + DFP-vergiftetes Serum
- c) = mit E 600 vergiftetes Gemisch aus Hämolysat und DFP-vergiftetem Serum

Tabelle 3 Beeinflussung der Aktivität menschlicher Erythrozyten-Acetylcholinesterase nach Vergiftung mit E 600 (0,0-Diäthyl-0-(p-nitrophenyl)-phosphat) in $1,0 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration

Per- sonen		Serum- typ	a)	Diff. a)-b)	b)	c)	Restaktivität in % der Hämoly- sataktivität
Bau.	♀	niedrig	263	48	215	41	19
Schö.I.	♀	hoch	277	21	256	116	45,3
Bau.	♀	niedrig	215	99	116	39	33,6
Gel. H.	♂	hoch	270	21	251	150	60
Gel. M.	♀	niedrig	479	69	410	224	54,6
Mach.	♂	hoch	372	55	317	191	61,2
Mer.	♂	niedrig	378	23	355	107	30,1
Schö.I.	♀	hoch	363	42	321	125	38,9
Op.	♂	niedrig	326	34	292	175	58,7
Rei.	♂	hoch	372	18	354	231	65,3
Wal. H.	♀	niedrig	299	38	237	115	48,5
Schö.P.	♀	hoch	338	18	320	188	58,7
Wal. E.	♂	niedrig	314	10	304	121	39,8
Gel. H.	♂	hoch	301	6	294	193	65,6
Schü.	♂	niedrig	347	25	322	154	47,8
Schö.K.	♂	hoch	371	35	336	235	69,9

D) DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Nach Inkubation menschlicher Serumcholinesterase 3.1.1.8. mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration ist eine Einteilung in drei Gruppen mit niedriger (0 - 5,5 %), mittlerer (13 - 20 %) und hoher (29 - 48 %) Restaktivität möglich. Die entsprechende Erythrozyten-Acetylcholinesterase 3.1.1.7. läßt unter vergleichbaren Bedingungen solch eine Gruppenbildung nicht zu, sie ist vielmehr nach Untersuchungen an Vertretern aller drei Serumgruppen durch E 600 mit nur geringer Streuung in gleichem Maße hemmbar.

Vergiftet man die Serumcholinesterase von Versuchspersonen mit niedrigem und hohem Serumtyp irreversibel mit DFP und ersetzt sie dann durch die Erythrozyten-Acetylcholinesterase, so ist nun nach partieller Vergiftung mit E 600 wieder eine entsprechende Gruppenbildung möglich. Die Unterschiede zu den Ansätzen mit reinem Erythrozytenhämolysat sind signifikant. Damit ist gezeigt, daß die von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) bei Vergiftung von Serumcholinesterase mit E 600 ($c = 3,2 \times 10^{-8}$ m) festgestellte Gruppenbildung keine Eigenschaft der Serumcholinesterase ist. Sie ist vielmehr auf eine andere Serumeigenschaft zu beziehen.

Es liegt nahe, anzunehmen, daß es sich hierbei um die von KRISCH (1968) in menschlichem Serum nachgewiesene Arylesterase 3.1.1.2. handelt, die während des Ablaufs der Hemmung der Cholinesterase durch E 600 die Hemmstoffkonzentration infolge unterschiedlicher Geschwindigkeit in der Hemmstoffspaltung so variiert, daß unterschiedliche Restaktivitäten der Cholinesterase verbleiben, wobei es offensichtlich keine Rolle spielt, ob es sich bei dem hemmbaren Ferment um Serumcholinesterase 3.1.1.8. oder Acetylcholinesterase 3.1.1.7. handelt.

Diese Deutung des von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF gefundenen Phänomens ist umso wahrscheinlicher, als, wie gezeigt werden konnte, bei 50 Versuchspersonen die Aktivität der nach KRISCH (1968) gemessenen Arylesterase und die von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) festgestellten Serumtypen eine starke Korrelation aufweisen derart, daß Personen mit niedriger Arylesteraseaktivität im Serum auch eine niedrige Serumcholinesteraseaktivität nach Vergiftung mit E 600 in geeigneter Konzentration aufweisen (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, PETENYI und BAUMGARTNER).

E) LITERATURVERZEICHNIS

1. ALDRIDGE, W.N.:
Serum esterases. 1. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.
Biochem. J. 53, 110 (1953a)
2. ALDRIDGE, W. N.:
Serum esterases. 2. An enzyme, hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-Esterase of mammalian sera.
Biochem. J. 53, 117 (1953b)
3. AMMON, R.:
Die fermentative Spaltung des Acetylcholins.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934)
4. FRIEDBERG, K.D. und SAKAI, F.
Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methjodid, PAM).
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)

5. FRIEDBERG, K.D. und W.D. ERDMANN:
Spontane Reaktivierung der durch Alkylphosphate
(Paraoxon, Systox, Isosystox) blockierten Cholin-
esterase in vitro.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmakol. 237, 1 (1959)
6. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M. und H.H. LINDORF:
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
cholinesterasen mit Alkylphosphaten.
Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesellschaft
für Rechtsmedizin in Berlin 6. - 9.10.1969 (a)
7. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., U. RABAST und
H.H. LINDORF:
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitro-
phenyl)-phosphat).
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)
8. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., PETENYI, M. und
W. BAUMGARTNER:
In Vorbereitung.

9. GOEDDE, H.W., A. DOENICKE und K. ALTLAND:
Pseudocholinesterasen.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967
10. KRISCH, K.:
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-
phosphat (E 600) durch menschliches Serum.
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6, 41 (1968)
11. LINDORF, H.H.:
Untersuchungen zur Ursache der unterschiedlichen
Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit
E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat).
Dissertation, Erlangen 1971
12. SKRINJAIC-SPOLJAR, M. und E. REINER:
Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenyl-phosphate and
ethyl-p-nitrophenyl-ethylphosphanate by human sera.
Biochem. Biophys. Acta 165, 289 (1968)
13. SÜLLMANN, E.:
Manometrische Methode zur Untersuchung des
Gewebsstoffwechsels.
in: Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-
Chemischen Analyse. Bd. VI A, Teil A.
hrsg. von K. Lang und E. Lehnartz
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-
New-York 1964

Herrn Prof.Dr.Dr. E. Weinig danke ich für die freundliche Unterstützung durch Überlassung eines Arbeitsplatzes, für Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit und die Übernahme des Korreferates.

Bei Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt bedanke ich mich besonders herzlich für die Überlassung des Themas und für ihre stets in übergroßem Maße gewährte freundliche Hilfe.

Frau M. Pétenyi bin ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung dankbar.

Lebenslauf

Am 27.3.1945 wurde ich, Irmgard Johanna Walter, geb. Schödel, als zweite Tochter des Stabsarztes und späteren Frauenarztes Dr. Karl Schödel und seiner Ehefrau Else, geb. Keck, in Erlangen geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Erlangen wechselte ich in das Mädchenrealgymnasium in Fürth über und legte dort im Sommer 1965 die Reifeprüfung ab. Im WS 1965/66 begann ich mit dem Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, das ich dort im Juli 1971 mit dem zahnärztlichen Staatsexamen beendete.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
